

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713003

研究課題名(和文) 発現タンパク質の構造 動態 活性の最適化によるインターフェロン癌遺伝子治療法開発

研究課題名(英文) Development of interferon cancer gene therapy by optimizing structure/pharmacokinetics/activity of transgene product

研究代表者

高橋 有己 (Takahashi, Yuki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00547870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、効果的なインターフェロン- β (IFN β) 癌遺伝子治療法の開発を目的として、血栓に親和性を有するペプタペプチド(CREKA)を融合したIFN β 誘導体を新たに設計した。CREKA融合IFN β 誘導体発現プラスミドDNA(pDNA)を構築し、担癌マウスにハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入したところ、腫瘍組織中の血栓へのIFN β の結合が認められた。また、CREKA融合IFN β 誘導体発現pDNA投与により、腫瘍体積の増大が抑制された。以上、本研究で開発したCREKA融合IFN β 誘導体は、IFN β 癌遺伝子治療における抗腫瘍効果の増強に有用であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we designed IFN β derivatives fused with a fibrin-binding pentapeptide (CREKA) for the development of effective IFN β cancer gene therapy. We constructed plasmid DNA (pDNA) expressing an IFN β -CREKA fusion protein and administered the pDNA into tumor-bearing mice by hydrodynamic injection. The fusion protein was detected to bind to fibrin clots in the tumor tissue. Moreover, tumor growth was suppressed by the administration of the pDNA. In conclusion, it was shown that IFN β -CREKA fusion protein can be used to improve therapeutic effect of IFN β cancer gene therapy.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：インターフェロン 遺伝子治療 DDS

1. 研究開始当初の背景

インターフェロン (IFN) は抗ウイルス活性、抗腫瘍活性、免疫調節作用など種々の生理活性を持つサイトカイン群であり、癌やウイルス感染などの種々の疾患に対する治療薬として臨床応用されている。しかしながら、IFN の生体内半減期は数時間程度と短いため、治療には頻回投与が必要とされる。IFN の場合には、ポリエチレングリコール (PEG) で修飾した PEG-IFN が臨床適用され、投与回数を 1 週間に 1 回にまで削減することが可能となっている。しかしながら、PEG 修飾に代表されるタンパク質への化学修飾は IFN の生物活性を大きく低下させることや、ロット間のバラツキが問題となる。これに対し、治療用タンパク質をコードした cDNA を投与する遺伝子治療は、生物活性を損なうことなくタンパク質を持続的に供給可能な代替法になるものとして期待される。我々は、IFN 発現プラスミドベクターの開発に取り組み、プラスミド DNA 水溶液を急速に静脈内投与することで肝臓においてウイルスベクターに匹敵する高レベルの遺伝子発現を得られるハイドロダイナミクス法 (HD 法) を利用して、設計したベクターの有用性を評価した。その結果、プラスミド DNA (pDNA) 中の CpG モチーフ数を削減したプラスミドベクターの開発により、遺伝子発現の持続化と癌治療効果の増強に成功した。さらに、CpG 削減ベクターとヒト ROSA26 プロモーターを組み合わせることで、より安定な IFN 発現が得られることも明らかにした。

上述の通り、IFN を持続的に発現させる遺伝子治療システムの開発に成功し、これにより治療効果を増強できることを明らかとした。一方で、IFN 持続発現型ベクターを高投与量で投与した際には、全身循環中に高濃度の IFN が長時間滞留することによると推察される致死的な有害作用も観察された。以上の結果から、腫瘍組織における IFN 濃度を選択的に増大し、全身循環中の IFN 濃度を低く抑えることができれば、副作用の軽減と治療効果の増強が実現可能と考えた。そこで申請者は、癌あるいはウイルス性肝炎を標的とした IFN 遺伝子治療を念頭に、遺伝子導入部位から全身循環中への IFN の移行を抑制することで血中 IFN 濃度を低く抑えるとともに標的 (遺伝子導入) 部位特異的濃度上昇による、副作用軽減ならびに治療効果増強を試みた。IFN を標的部位にアンカーする方法として細胞外マトリクスに結合親和性を有するヘパリン結合ドメイン (HBD) を選択し、HBD 融合 IFN 発現 pDNA を開発した。肝転移腫瘍に対し HD 法で直接導入後の肝転移結節数ならびに体重変化の評価により、HBD 融合 IFN 発現 pDNA は天然型 IFN 発現 pDNA と比較して同等以上に腫瘍増殖を抑制しつつ、IFN の副作用の一つである体重減少がほとんどないことを見出した。以上、HBD を利用した IFN 組織分布制御法は IFN 遺伝子

治療の実現に有用と考えられるものの、癌治療への適用は腫瘍組織に直接遺伝子導入が可能な場合に限られる。

そこで、IFN 遺伝子治療の適用の拡大を目的として、IFN をマウス血清アルブミン (MSA) との融合タンパク質 IFN-MSA を設計し、血中滞留性の向上による腫瘍ターゲティングの可能性について検討した。MSA との融合タンパク質とすることで IFN の生物活性は天然体の IFN と比較して 100 分の 1 以下に大きく低下したものの、*in vivo* 遺伝子導入の結果、本手法により血中滞留性と腫瘍集積性が改善できることが示された。このとき生物活性が著しく低下したにも関わらず、天然型 IFN と同等の治療効果が得られたが、これは腫瘍集積性の改善によるものと推察された。したがって、生物活性の低下を回避しつつ腫瘍集積性を改善することができれば、その治療効果の増強が可能ではないかと考えられる。

以上の結果から、IFN タンパク質の構造を適切にデザインし、発現する IFN の体内動態を精密に制御し、その生物活性を低下することなく腫瘍特異性を向上させることができれば、より有効性が高い IFN 癌遺伝子治療法が開発可能と考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍特異的な体内動態を有する IFN 融合タンパク質の構築を目指した。腫瘍組織では、血栓の形成が亢進しており、腫瘍特異的微小環境の特徴の一つである。したがって、血栓を標的とすることで、腫瘍特異的な薬物送達の可能性が考えられる。そこで本研究では、IFN の腫瘍組織移行性の向上、ならびに治療効果の改善を目的として、腫瘍血栓に結合親和性を示すペプチド (CREKA) を IFN に融合した IFN-CREKA 融合タンパク質をデザインした。また、CREKA の作用によって腫瘍血栓に結合した IFN を血栓より解離させがん細胞に作用させることを目的として、腫瘍組織に高発現するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2 により切断される配列を IFN と CREKA の間にリンカーとして組み込んだ IFN-mmp-CREKA も別途設計した。

3. 研究の方法

pDNA の構築

血栓結合性ペプチドとして 5 個のアミノ酸 CREKA を選択し、IFN- の C 末端に融合した IFN-CREKA を設計した。併せて、CREKA と IFN- の間のリンカー部分に MMP 認識配列である 7 アミノ酸 CPLGLAG からなる mmp リンカーを組み込んだ IFN-mmp-CREKA も設計し、それぞれの cDNA を持続発現型ベクターである、pCpG-mcs ベクター (Invivogen 社) に組み込むことで、各融合タンパク質発現 pDNA を構築した。対照ベクターとして、天然型 IFN を pCpG-mcs ベクターに組み込んだプラス

ミド DNA を用いた。コントロールベクターとして、生理作用を有さないレポータータンパク質である gLuc をコードした pDNA である pCpG-gLuc を使用した。

IFN 発現量の定量

構築した pDNA をアフリカミドリザル腎細胞株 COS7 細胞に導入し、上清中の各融合 IFN タンパク質の量を ELISA 法により測定した。

Western blotting 法

COS7 細胞に天然型 IFN あるいは CREKA 融合 IFN 誘導体を発現する pDNA をトランスフェクションした後、培養上清を回収し、SDS-PAGE を行った後、タンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を IFN 特異抗体と反応させたのち、HRP 標識二次抗体と反応させた。HRP 活性により放出される化学発光を検出した。

生物活性の評価

COS7 細胞に天然型 IFN あるいは CREKA 融合 IFN 誘導体を発現するプラスミド DNA をトランスフェクションした後、培養上清を回収し、回収された IFN の量を ELISA 法により定量した。IFN-gamma activated site (GAS) 駆動性のルシフェラーゼ発現 pDNA (pGAS-Luc) を遺伝子導入したマウスメラノーマ細胞株 B16-BL6 細胞に対し、回収した天然型 IFN あるいは各 CREKA 融合 IFN を種々の濃度で添加した。一定時間経過後に細胞画分のルシフェラーゼ活性を測定することで融合 IFN の生物活性を評価した。

マウスへの遺伝子導入

ハイドロダイナミクス法を用いてマウス肝臓に天然型 IFN あるいは CREKA 融合 IFN 誘導体を遺伝子導入した。遺伝子導入後に経時的に採血し、ELISA 法により血中 IFN 濃度推移を評価した。

担癌モデルマウスの作製

マウス結腸癌細胞株 colon26 細胞を皮下に移植することで、担癌モデルマウスを作製した。

免疫蛍光染色による腫瘍組織内 IFN および血栓の検出

ハイドロダイナミクス法を用いて各 pDNA を遺伝子導入し 1 日後に腫瘍組織を回収した。回収した腫瘍組織の凍結切片を作製し、IFN およびフィブリン特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。染色した切片は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

抗腫瘍効果の評価

担癌モデルマウスに対して各 pDNA を投与後、経時的に腫瘍体積を測定することで抗腫瘍効果を判定した。

4. 研究成果

CREKA 融合 IFN タンパク質の発現確認

IFN の C 末端に CREKA を融合した IFN -CREKA を設計した。また、IFN と CREKA との間に mmp リンカーを挿入した IFN -mmp-CREKA も別途設計した。本研究で構築した CREKA 融合 IFN 誘導体発現 pDNA の模式図を図 1 の左に示す。

各 IFN 発現 pDNA を遺伝子導入した COS7 細胞から回収した培養上清中の IFN を Western blotting 法にて検出した。その結果、各 IFN 誘導体の分子量である約 18kDa に対応する位置にバンドが検出されたことから、設計通りの IFN 誘導体の発現が確認された (図 1 右)。

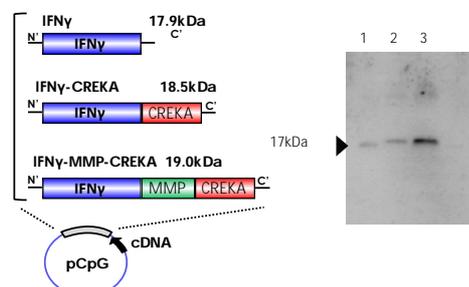


図 1. (左) IFN および CREKA 融合 IFN 誘導体発現 pDNA の模式図 (右) Western blotting 法による IFN および CREKA 融合 IFN 誘導体の検出

CREKA 融合 IFN タンパク質の生物活性評価

各 IFN 発現 pDNA を遺伝子導入した COS7 細胞から回収した培養上清をサンプルとして、pGAS-Luc を用いたレポーターアッセイにより天然型 IFN および CREKA 融合 IFN 誘導体の生物活性を評価した (図 2)。得られた用量活性化曲線より半数効果濃度 (EC₅₀) を算出したところ、IFN は 460pg/ml、IFN -CREKA が 500pg/ml、IFN -mmp-CREKA が 740 pg/mL となり、IFN -CREKA は天然体の IFN とほぼ同等の生物活性を有している一方で、IFN -mmp-CREKA の生物活性は天然体の IFN の約 70% 程度であることが明らかとなった。したがって、活性が 100 分の 1 以下にまで低下した MSA の場合とは異なり、CREKA あるいは mmp-CREKA の IFN への融合は、IFN の生物活性をほとんど損なわないことが明らかとなった。

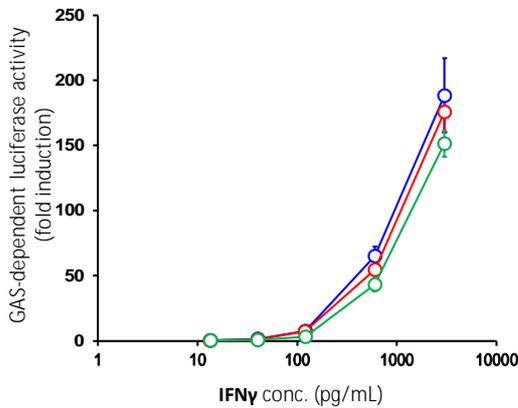


図2. pGAS-Lucを用いたIFN およびCREKA融合IFN 誘導体の生物活性の評価

マウスへの遺伝子導入後の CREKA 融合 IFN タンパク質発現プロファイル評価

各 IFN 発現 pDNA を遺伝子導入したマウスから経時的に血漿を回収し、血漿中 IFN 濃度を測定した。その結果、いずれの IFN 発現 pDNA の投与によっても、2 週間以上にわたって持続的な IFN 発現が得られることを確認した (図3)。

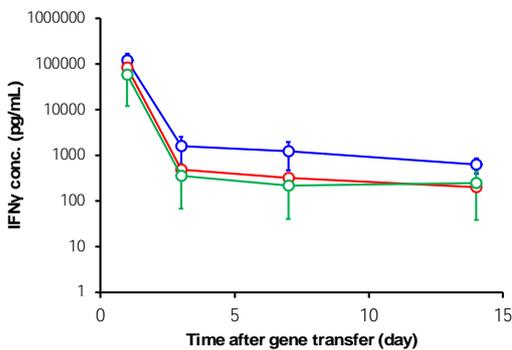


図3. IFN およびCREKA融合IFN 誘導体発現pDNAを導入したマウスにおける血漿中IFN 濃度推移

腫瘍組織中における CREKA 融合 IFN 誘導体の局在評価

担癌マウスに対して、各 IFN 誘導体の発現 pDNA を投与した。このとき、コントロール pDNA として生理作用を有さないレポータータンパク質である gLuc をコードした pDNA も別途投与した。遺伝子導入後、腫瘍組織を回収し、凍結切片を作製した。IFN およびフィブリン特異的の抗体で免疫蛍光染色した後、共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、IFN -CREKA および IFN -mmp-CREKA 発現 pDNA を投与したマウスの腫瘍組織において、IFN とフィブリンとの共局在が観察された (図4)。一方で、天然体の IFN を遺伝子導入したマウスの腫瘍組織においては、腫瘍組織中において免疫蛍光染色によって染色される IFN はほとんど検出されず、血栓との IFN 共局在も観察されなかった。これは、IFN の腫瘍集積性がそれほど高くない、あるいは可溶性タンパク質である IFN が免疫蛍光染色操作により洗い流されてしまったためではないかと考えられる。以上の結果

から、CREKA 融合 IFN 誘導体は血栓に結合し、腫瘍に集積することが示唆された。

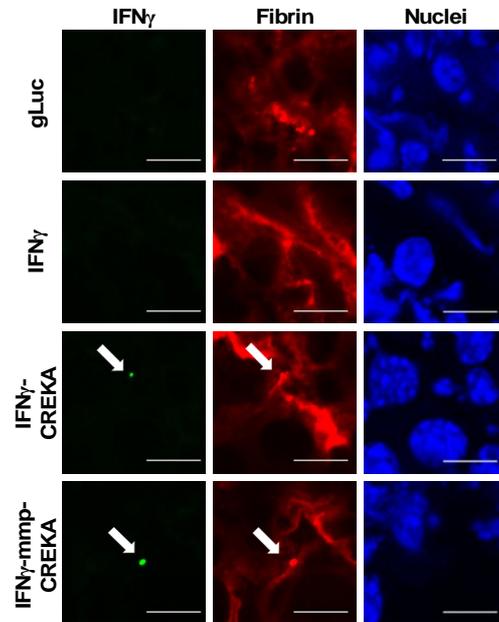


図4. 腫瘍組織中でのIFN 誘導体および血栓の免疫蛍光染色法による検出 (矢印はIFN と血栓の共局在を示す)

担癌マウスを用いた抗腫瘍効果の評価

担癌マウスに対して各 IFN 融合タンパク質を遺伝子導入し、経時的に腫瘍体積を測定することで抗腫瘍効果の評価した。その結果、IFN あるいはその誘導体の遺伝子導入により腫瘍増殖が抑制される傾向が観察された。特に、IFN -mmp-CREKA の遺伝子導入により腫瘍組織の増殖が対照群と比較して、有意に抑制された (図5)。IFN -mmp-CREKA は、腫瘍組織中の血栓に結合することで腫瘍組織に集積した後、MMP2 により CREKA と IFN の間の mmp リンカーが切断される。したがって、血栓からの IFN の解離が期待しづらい IFN -CREKA と比較して IFN -mmp-CREKA は直接癌細胞に作用する IFN 量が多くなることが期待できるために、IFN -mmp-CREKA は高い治療効果を示したのではないかと推察される。

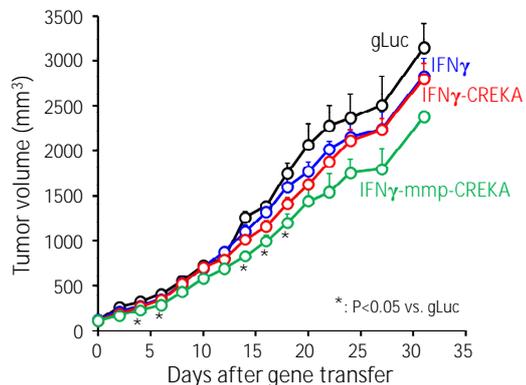


図5. IFN およびCREKA融合IFN 誘導体発現pDNAを導入したマウスにおける腫瘍組織体積の推移

以上、今回デザインした IFN 誘導体は腫瘍組織に存在する血栓に結合可能であり、IFN の抗腫瘍効果を改善できる可能性を有することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Ando M, Takahashi Y, Yamashita T, Fujimoto M, Nishikawa M, Watanabe Y, Takakura Y. Prevention of adverse events of interferon gene therapy by gene delivery of interferon -heparin-binding domain fusion protein in mice. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2014;1; 23. doi: 10.1038/mtm.2014.23.

Kiyota T, Takahashi Y, Watcharanurak K, Nishikawa M, Ohara S, Ando M, Watanabe Y, Takakura Y. Enhancement of Anticancer Effect of Interferon-Gene Transfer against Interferon-Resistant Tumor by Depletion of Tumor-Associated Macrophages. *Mol Pharm.* 2014 5;11:1542-1549. doi: 10.1021/mp4007216.

[学会発表](計 4 件)

安藤 満、高橋有己、西川元也、平賀信彦、今村道雄、茶山一彰、高倉喜信 ヒト肝細胞キメラマウスを用いたインターフェロン 遺伝子導入による治療抵抗性慢性 C 型肝炎治療 .第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013 年 7 月 3 日-4 日、京都テルサ(京都府・京都市)

濱名温志、安藤 満、藤本真衣、高橋有己、西川元也、高倉喜信 血栓結合型インターフェロン 誘導体の遺伝子導入によるインターフェロン 癌遺伝子治療効果の増強 . 日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 26 日、兵庫医療大学(兵庫県・神戸)

藤本真衣、安藤 満、高橋有己、濱名温志、西川元也、高倉喜信 腫瘍血栓結合性ペプチド融合インターフェロンの設計と遺伝子導入による腫瘍指向性インターフェロン遺伝子治療法の開発 . アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014、2014 年 9 月 8 日 9 日、東京医科歯科大学(東京都・文京区)

藤本真衣、安藤満、高橋有己、西川元也、濱名温志、高倉喜信 血栓結合型インターフェロン 誘導体の遺伝子導入によ

るインターフェロン 癌遺伝子治療効果の増強 . 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年 10 月 17 日、大阪大谷大学(大阪府、富田林市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 有己(TAKAHASHI, YUKI)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 00547870